

High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Kit de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Multiplex de Alto Riesgo de HPV, IVD

REF MD04921, 96 reacciones

Solo para uso diagnóstico in vitro profesional



ES

Instrucciones de Uso

MD0492_IM_es

VERSION 2401, enero 2024



Contenido

1. Introducción.....	3
2. Uso Previsto	3
3. Principios de la prueba.....	3
4. Kit Composition.....	4
5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación.....	4
6. Materiales e instrumentación necesarios, pero no proporcionados.....	4
7. Recolección y preparación de muestras	4
8. Precauciones y Advertencias	4
8.1. Información de seguridad	5
8.2. Requisitos de manipulación y procedimiento.....	5
9. Procedimiento de prueba	5
9.1. Configuración de la reacción.....	5
9.2. Programación del instrumento de PCR en tiempo real	6
10. Análisis de los datos	6
10.1. Ejecutar criterios de validación.....	6
10.2. Interpretación de los resultados de la prueba.....	6
11. Evaluación del desempeño	7
11.1. Resultados previstos	8
11.2. Límite de detección (LoD) - Sensibilidad analítica	8
11.3. Especificidad Analítica.....	8
11.3.1. Reactividad Cruzada (Exclusión) y Especificidad.....	8
11.3.2. Sustancias que interfieren	9
11.4. Precisión.....	9
11.4.1. Repetibilidad	11
11.4.2. Reproducibilidad Diaria.....	11
11.4.3. Reproducibilidad Lote a Lote	11
11.4.4. Reproducibilidad del Operador.....	11
11.4.5. Reproducibilidad entre Instrumentos.....	11
11.5. Evaluación clínica	11
12. Control de calidad	12
13. Apoyo técnico	12
14. Marcas registradas y descargos de responsabilidad.....	13
15. Explicación de los símbolos.....	13
16. Declaración de conformidad.....	14
17. Referencias.....	15

1. Introducción

Los papilomavirus constituyen un diverso grupo de virus de ADN capaces de infectar tanto la piel como las membranas mucosas de humanos y animales. El virus del papiloma humano (VPH) es particularmente significativo, ya que está implicado en más del 99% de los cánceres cervicales a nivel mundial¹⁻³. Aunque se han catalogado más de 200 tipos distintos de VPH, al menos 14 han sido clasificados como de alto riesgo (VPH AR) debido a su asociación con el inicio de lesiones mucosas que pueden progresar a cáncer cervical y otras complicaciones. El cáncer cervical, clasificado como el segundo tumor maligno más común en mujeres, subraya la gravedad de las preocupaciones de salud relacionadas con el VPH a nivel mundial. Más allá de su potencial oncogénico, el VPH tiene la dudosa distinción de ser la infección de transmisión sexual más prevalente a escala global^{4,5}.

Los VPH de alto riesgo incluyen los tipos 16 y 18, responsables de aproximadamente el 70% de las lesiones cancerosas más graves⁶. Otros tipos de alto riesgo, como el VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68, contribuyen colectivamente a más del 90% de los adenocarcinomas cervicales⁷⁻¹⁰. La progresión a la malignidad se vincula frecuentemente con la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped, lo que resalta la compleja interacción entre los factores virales y la biología del huésped. Notablemente, la coinfección con subtipos de VPH de alto riesgo ha surgido como un factor de riesgo discernible para una incidencia elevada de la enfermedad⁶.

Hoy en día, el cribado o diagnóstico de VPH AR se realiza principalmente mediante técnicas citológicas que tienen menos especificidad y sensibilidad que las técnicas moleculares². La citología cervicovaginal o citología en base líquida son competentes detectando lesiones precursoras e indicando cáncer cervical tras la infección por VPH¹¹. Sin embargo, aunque son efectivas identificando lesiones precursoras e indicando la presencia de cáncer cervical después de la infección por VPH, estos métodos tienen limitaciones para distinguir entre diferentes tipos de virus, específicamente varios tipos de VPH de alto riesgo. Un avance significativo en la precisión diagnóstica es evidente con los ensayos de PCR en tiempo real, proporcionando una metodología rápida y potente para la detección eficiente de tipos distintos de VPH AR⁸.

2. Uso Previsto

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech es una prueba molecular diseñada para la detección cualitativa rápida del ADN viral del Papilomavirus Humano de Alto Riesgo (VPH) en muestras biológicas humanas obtenidas a través de citología cervical por un clínico. La prueba realiza la amplificación multiplexada del ADN objetivo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para 14 tipos de VPH de alto riesgo en una sola reacción. El kit identifica específicamente a HPV16 y HPV18 en dos canales de detección distintos e informa sobre los 12 tipos de alto riesgo restantes (HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 y HPV68) en un resultado agrupado detectado en el mismo canal. El propósito de esta prueba es evaluar la presencia o ausencia de los 14 tipos de VPH de alto riesgo. Esta información, combinada con la evaluación del médico sobre el historial médico del paciente, otros factores de riesgo y la adhesión a las guías profesionales, puede usarse para guiar el cuidado del paciente. El kit está destinado para ser utilizado por personal de laboratorio capacitado, específicamente instruido en técnicas de PCR en tiempo real y diagnósticos *in vitro*.

3. Principios de la prueba

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech incluye un conjunto completo de reactivos, enzimas y oligonucleótidos (cebadores y sondas) para la detección cualitativa de VPH AR utilizando plataformas comunes de PCR en tiempo real (consulte la Sección 6 para las especificaciones del instrumento requerido). Este kit permite la identificación de varios tipos de genomas de VPH de alto riesgo: HPV16, HPV39 y HPV68 a través de la amplificación de objetivos localizados en el gen E6; HPV18 a través de la amplificación de un objetivo en el gen E1; HPV31 mediante la amplificación de un objetivo ubicado en el gen E5; HPV33, HPV35, HPV52 y HPV58 amplificando objetivos en el gen E7 y, finalmente, HPV45, HPV51, HPV56, HPV59 y HPV66 mediante la amplificación de objetivos ubicados en el gen L1.

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech está meticulosamente diseñado para ofrecer el perfil de detección más amplio posible manteniendo la especificidad para los 14 genomas de VPH de alto riesgo mencionados anteriormente. El kit proporciona un conjunto completo de reactivos para la detección de los 14 genomas virales, apuntando a regiones altamente conservadas de los tipos de VPH de alto riesgo mediante cebadores y sondas altamente optimizados. Además, incluye un control interno eficiente para la detección del gen humano β -actina (ACTB) utilizando un conjunto específico de cebadores y sonda, para confirmar la extracción exitosa del ADN de la muestra y la ausencia de inhibidores de PCR. Los oligonucleótidos están específicamente diseñados para la detección de HPV y no muestran homología significativa con otros genomas, lo que refleja la alta especificidad y sensibilidad de detección de la prueba. Este diseño asegura la alta especificidad y sensibilidad de detección de la prueba, evitando la detección de otros organismos que causan infecciones similares. La evolución natural del virus detectado por este kit implica que con el tiempo estará disponible nueva información de secuencia, lo que refleja bien las estrategias de adaptación viral conocidas. Por lo tanto, NZYtech revisa periódicamente los objetivos genómicos virales y, si es necesario, lanzará nuevas versiones de este kit.

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD utiliza la técnica de PCR en tiempo real para la determinación cualitativa del ADN, un estándar en el diagnóstico molecular de laboratorio. Esta metodología altamente sensible y específica asegura la detección precisa de varios tipos de VPH de alto riesgo. El principio del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD consiste en el uso de ADN aislado y purificado a través de un sistema de extracción para buscar la presencia de ADN viral. El ADN extraído se somete a la amplificación de PCR multiplex en una sola reacción, empleando conjuntos de cebadores y sondas altamente específicos basados en el principio TaqMan[®]. Durante la amplificación, las sondas se unen selectivamente a sus genes objetivo, y a medida que el ADN se amplifica, la degradación de estas sondas, flanqueadas por dos cebadores, conduce a la separación del colorante reportero del apagador, aumentando la fluorescencia. Para identificar la amplificación de los 15 objetivos específicos en una sola reacción - HPV16, HPV18, doce VPH AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), y ACTB humano - las sondas específicas están etiquetadas con diferentes fluoróforos, a saber, Texas Red[®], Cy5[™], FAM[™] y HEX[™] tintes reporteros, respectivamente. Además, los conjuntos de cebadores/sondas se proporcionan en concentraciones optimizadas asegurando que la amplificación de ácidos nucleicos menos abundantes no se vea comprometida cuando otros objetivos virales están presentes en concentraciones más altas. Este diseño meticuloso garantiza la fiabilidad y precisión del kit en la detección de los 14 genomas de VPH de alto riesgo especificados.

4. Kit Composition

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech proporciona un conjunto completo de reactivos suficientes para realizar 96 reacciones de PCR en tiempo real en un solo paso.

COMPONENTE DEL KIT		VOLUMEN (POR VIAL)	NÚMERO DE TUBOS	COLOR DE LA TAPA
HPV MMix	Mezcla maestra de sonda NZYSupreme qPCR Multiplex (2x)	1050 µL	1	Neutral
HPV PPMix	Mezcla de cebadores y sondas de HPV HR/ACTB (10x)	205 µL	1	Marrón
HPV POS	Control positivo de HPV HR/ACTB	105 µL	1	Roja
NTC	Control sin plantilla	105 µL	1	Neutral

5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech se envía refrigerado. Todos los componentes deben almacenarse inmediatamente a una temperatura de -85 °C a -15 °C a su llegada. Durante su uso, los componentes del kit deben volver al congelador rápidamente después de usarlos para minimizar el tiempo a temperatura ambiente.

- Minimice el número de ciclos de congelación y descongelación almacenando en alícuotas de trabajo. Si es apropiado, los componentes del kit pueden ser divididos en volúmenes más pequeños después de descongelarlos. El kit es estable al menos hasta 10 ciclos de congelación y descongelación.
- El HPV PPMix debe almacenarse y protegerse de la luz. En particular, no exponga el HPV MMix a la luz solar directa después de combinarlo con el HPV PPMix.
- Si el paquete que protege el kit llegó dañado, por favor contacte a NZYtech.
- Preste atención a la fecha de caducidad indicada en el empaque. NZYtech no recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad. En esta fecha, el kit debe ser desechado siguiendo las instrucciones de eliminación en la **Sección 8.2**.

6. Materiales e instrumentación necesarios, pero no proporcionados

- Instrumento de PCR en Tiempo Real que incluya canales de fluorescencia Texas Red/JUN, FAM, VIC/HEX/JOE y Cy5 (a longitudes de onda de emisión de 615, 520, 556 y 670 nm, respectivamente). Consulte en la Sección 11 los modelos de instrumentos para los cuales el kit fue validado.
- Equipos y consumibles para aislar ADN viral de muestras biológicas/clínicas.
- Material plástico para qPCR libre de RNasa/DNasa: tubos de PCR, tiras, tapas, placas de 96 pocillos y películas adhesivas.
- Pipetas y puntas de filtro (libres de RNasa/DNasa).
- Bloque de enfriamiento.
- Guantes desechables.
- Vortex y centrifuga.

7. Recolección y preparación de muestras

El kit está diseñado para la detección de ADN extraído de muestras cervicales (solución de base líquida para citología). Varios factores, incluyendo el procedimiento de recolección de la muestra biológica, transporte, almacenamiento y tiempo de procesamiento de la muestra, son de suma importancia para garantizar la integridad de la muestra y lograr resultados óptimos. Para una recolección efectiva, se recomienda que las muestras deben obtenerse utilizando un hisopo/espátula endocervical, que debe ser resuspendido en solución PreservCyt® (Hologic Corp.) o medio de Amies. Posteriormente, las muestras deben sellarse herméticamente en tubos o contenedores apropiados, etiquetarse con precisión y transportarse rápidamente al laboratorio. Se recomienda probar las muestras recolectadas lo antes posible para mantener la precisión de los resultados. El incumplimiento de los procedimientos adecuados de recolección, manipulación y/o transporte de muestras puede llevar a resultados inexactos. Los ácidos nucleicos extraídos constituyen el material inicial para el ensayo con el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit de NZYtech, IVD. NZYtech recomienda el uso del kit de purificación de ácidos nucleicos basado en tecnología de perlas magnéticas: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech). Este kit ha sido validado para la extracción de muestras clínicas de VPH y su posterior detección utilizando el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit de NZYtech, IVD. Por favor, asegúrese de que no haya ocurrido contaminación cruzada y de que las muestras de ADN sean adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad de los ácidos nucleicos. El kit de NZYtech contiene un control interno que apunta al ADN humano copurificado con el ADN viral de HPV. El ADN humano se amplifica con el conjunto de oligonucleótidos (cebadores y sonda) del gen de la β -actina humana. La introducción de un control interno es útil para evaluar la eficiencia de la extracción y aislamiento de ADN y/o para detectar la presencia de inhibidores potenciales durante el procesamiento de muestras.

8. Precauciones y Advertencias

Siga cuidadosamente los procedimientos y directrices proporcionados en este manual para garantizar que la prueba se realice correctamente. Antes de usar la prueba, verifique la integridad del producto, especialmente la cantidad y el tipo de componentes del kit y su etiquetado correcto. Como en cualquier procedimiento de análisis, las buenas prácticas de laboratorio son esenciales. Cualquier desviación de ellas puede provocar el fracaso del ensayo o resultados erróneos. Debido a la alta sensibilidad del kit, se debe tener especial cuidado para mantener los reactivos y las mezclas de amplificación de PCR libres de contaminación.

8.1. Información de seguridad

Antes de usar el kit, consulte la Hoja de Datos de Seguridad (SDS) disponible en el sitio web de NZYtech (www.nzytech.com). Esta detección del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD debe ser realizada solo por personal capacitado en los procedimientos técnicos y de seguridad relevantes en laboratorios adecuadamente equipados. Se deben seguir las pautas internacionales y nacionales sobre seguridad biológica en laboratorios en todas las circunstancias.

8.2. Requisitos de manipulación y procedimiento

- Solo para uso diagnóstico *in vitro* profesional.
- No use este kit después de la fecha de caducidad.
- No utilice los componentes de la prueba si el sellado del kit está dañado.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes de producción.
- No se deben usar reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
- Se deben utilizar utensilios de plástico desechables libres de DNasa/RNasa y pipetas en todos los procedimientos.
- Utilice puntas de filtro libres de DNasa/RNasa en todo el protocolo para evitar la contaminación por aerosoles y líquidos.
- La preparación de muestras, la configuración de reacciones y la amplificación deben realizarse en diferentes áreas de trabajo. El orden de tareas en el laboratorio debe ser unidireccional. Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de entrar en un área diferente. Si es posible, cambie su bata entre diferentes procedimientos.
- Seleccione materiales y equipos específicos para cada área de trabajo y no los transfiera de un área a otra.
- Las muestras biológicas deben manipularse como si fueran infecciosas siguiendo las precauciones adecuadas de bioseguridad.
- Siempre use el Control sin plantilla (NTC, por sus siglas en inglés) proporcionado en el kit.
- Los controles positivos contienen plantillas con alto número de copias; deben abrirse y procesarse lejos de las muestras de prueba y los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Manipule las placas post-amplificación con cuidado y deséchelas inmediatamente después de finalizar la prueba; las placas siempre deben desecharse en un contenedor de bioseguridad adecuado después de su uso.
- Al final de cada prueba, limpie las superficies de trabajo y el equipo con un removedor de ADN/ARN (DNA & RNA Cleaner, MB462, NZYtech).
- Los residuos de productos químicos y preparaciones se consideran desechos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto de la historia médica del paciente y los síntomas clínicos.
- Esta prueba no puede excluir enfermedades causadas por otros patógenos.
- Un resultado negativo para cualquier prueba de PCR no descarta de manera concluyente la posibilidad de infección.
- Un resultado positivo no es un indicador definitivo de la presencia de enfermedad cervical de alto grado o la posibilidad de desarrollo de cáncer.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, use ropa de protección, use permanentemente guantes desechables sin polvo, use gafas de protección y una máscara. No coma, beba ni fume en el área de trabajo.

9. Procedimiento de prueba

Por favor, lea cuidadosamente las instrucciones de uso antes de realizar el ensayo. Tenga en cuenta que todos los pasos de pipeteo y la configuración experimental de la placa deben realizarse siguiendo las buenas prácticas de PCR en tiempo real. Después de verter la placa, comience inmediatamente con el protocolo de PCR en tiempo real. La incubación prolongada de las mezclas de reacción a temperatura ambiente puede provocar artefactos de PCR que reducen la sensibilidad de detección. Antes del experimento, comience mezclando suavemente los tubos de reacción proporcionados con el dedo y centrifugue durante cinco segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo. Coloque los tubos sobre hielo. **Recomendamos encarecidamente pipetear el HPV POS al final para evitar contaminaciones cruzadas.**

9.1. Configuración de la reacción

1. Prepara una mezcla de PCR en tiempo real suficiente para el número de pruebas a realizar con un volumen adicional del 5% para pérdidas durante el pipeteo. Procede de acuerdo con la tabla a continuación que especifica los volúmenes para 1 y n pruebas (donde n corresponde al número total de reacciones).

COMPONENTE	1 VOLUMEN PRUEBA (µL)	n PRUEBAS * VOLUMEN + 5% (µL)
HPV MMix **	10	n x 10,5
HPV PPMix	2	n x 2,1
VOLUMEN FINAL	12	n x 12,6

* Para calcular el número total de reacciones necesarias para cada ensayo, cuente el número de muestras y agregue dos más, para incluir los controles Negativo y Positivo.

** Por favor, tenga en cuenta que puede observarse un precipitado en el fondo del tubo de mezcla maestra después de múltiples ciclos de congelación/descongelación. Para garantizar un rendimiento óptimo, asegúrese de que todos los componentes estén descongelados y resuspendidos antes de usarlos. En este caso, no centrifugue la mezcla maestra antes de pipetear.

2. Pipetee 12 µL de la mezcla de PCR en tiempo real en pozos individuales de acuerdo con la configuración de su placa experimental de PCR en tiempo real.

3. Para el control negativo, agregue 8 µL de NTC en lugar de la plantilla de ADN en el pozo de control negativo. El volumen final debe ser de 20 µL.

4. Para las muestras biológicas, agregue 8 µL de cada muestra de ADN en los pozos de muestra, de acuerdo con la configuración de su placa experimental. El volumen final en cada pozo debe ser de 20 µL.

5. Para el control positivo, agregue 8 µL de Control Positivo de HPV HR/ACTB en lugar de la plantilla de ADN en los pozos de control positivo. El volumen final debe ser de 20 µL.

6. Cubra y selle la placa con una película adhesiva óptica apropiada o tapas antes de proceder con los pasos de PCR en tiempo real y detección.

7. Coloque la placa de reacción en el instrumento de PCR en tiempo real y ejecute el protocolo de PCR en tiempo real según la sección a continuación.

9.2. Programación del instrumento de PCR en tiempo real

La tabla a continuación muestra un protocolo estándar optimizado en algunas plataformas de PCR en tiempo real. Sin embargo, estas condiciones pueden adaptarse y validarse para ajustarse a protocolos específicos de diferentes máquinas.

Ajustes de PCR en tiempo real

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	PASO
1	95 °C	3 min	Activación de la polimerasa
45	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	30 s	Alineamiento/Extensión *

* Dependiendo del equipo de qPCR, seleccione los canales de detección apropiados. Los datos fluorogénicos deben recopilarse durante este paso a través de los canales indicados a continuación.

Colorantes Fluorescentes y Canales de Detección

DIANAS	COLORANTE FLUORESCENTE	CANALES DE DETECCIÓN
HPV16	Texas Red®	Texas Red/JUN
HPV18	Cy5™	Cy5
Other HR HPV	FAM™	FAM
ACTB	HEX™	VIC/HEX or JOE

El High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech ha sido validado para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 5 Dx, Bio-Rad® CFX C1000 Touch y Bio-Rad® CFX Opus. Si se utiliza otro equipo, el usuario deberá validar el kit utilizando muestras previamente caracterizadas (positivas y negativas).

10. Análisis de los datos

10.1. Ejecutar criterios de validación

El análisis de datos se realiza mediante el software del instrumento. Teniendo en cuenta las diferencias de rendimiento en diferentes equipos de PCR en tiempo real, los umbrales para las cuatro señales de fluorescencia (Texas Red, FAM, VIC y Cy5) se determinan automáticamente por el software con ajustes manuales en caso de ser necesario. Antes de analizar los resultados de las muestras, recomendamos verificar si la prueba de PCR en tiempo real es válida. Por lo tanto, para cada placa, confirme si los resultados para los controles Positivo y Negativo se realizaron como se esperaba, de acuerdo con los siguientes criterios:

Control positivo (HPV POS): la amplificación de las curvas de Texas Red (HPV16), Cy5 (HPV18), FAM (Otros HR HPV) y VIC (ACTB) es positiva. Se espera que el control positivo amplifique a Ct < 32, en los cuatro canales. La falta de satisfacción de este criterio de control de calidad es una fuerte indicación de que el experimento ha sido comprometido.

Control negativo (NTC): no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene curvas de amplificación (Texas Red, Cy5, FAM y VIC) con forma sigmoidea, puede haber ocurrido contaminación de la muestra. Repita la prueba siguiendo las buenas prácticas de qPCR.

Si los controles cumplen con lo esperado, la prueba es **válida**. Por favor, proceda con la interpretación de los resultados de las muestras analizadas.

Si alguno de los controles no muestra el rendimiento esperado, el ensayo se vio comprometido o se ejecutó de manera incorrecta y debe considerarse **inválido**. **Por favor, repita la prueba**. Si el problema persiste, póngase en contacto con el fabricante.

10.2. Interpretación de los resultados de la prueba

High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech usa los siguientes valores de Ct de corte para la interpretación de los resultados:

VALOR CT	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
Amplificación Ct ≤36	Detectado(+) → POSITIVO
No Amplificación Ct>36	No detectado (-) → NEGATIVO

El **HPV16** se detecta si la curva de amplificación de Texas Red muestra una forma sigmoidea con un Ct ≤ 36, independientemente del resultado obtenido para el ensayo de ACTB (VIC).

El **HPV18** se detecta si la curva de amplificación de Cy5 muestra una forma sigmoidea con un Ct ≤ 36, independientemente del resultado obtenido para el ensayo de ACTB (VIC).

Otros HR HPV se detectan si la curva de amplificación de FAM muestra una forma sigmoidea con un Ct ≤ 36, independientemente del resultado obtenido para el ensayo de ACTB (VIC).

El **HPV16, HPV18, Otros HR HPV** no se detectan si las curvas de amplificación de Texas Red, Cy5 y FAM no amplifican o amplifican a un Ct > 36, mientras que el ensayo de ACTB (VIC) muestra una curva sigmoidea positiva (Ct ≤ 45).

La prueba es inválida si los ensayos de HPV16, HPV18, Otros HR HPV y ACTB son negativos. La prueba debe repetirse con ácidos nucleicos repurificados de la muestra.

La siguiente tabla resume la interpretación de los resultados principales. Evalúe la forma general de las curvas de amplificación; **solo las curvas de amplificación sigmoideas son indicativas de una amplificación verdadera.**

HPV16 (TEXAS RED)	HPV18 (CY5)	OTROS HR HPV (FAM)	ACTB (VIC)	RESULTS INTERPRETATION
+	-	-	+/-*	HPV16 detectado → POSITIVO
-	+	-	+/-*	HPV18 detectado → POSITIVO
-	-	+	+/-*	Otros HR HPV detectado → POSITIVO (cualquiera o combinaciones de 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
+	+	-	+/-*	HPV16 y HPV18 detectados → POSITIVO
+	-	+	+/-*	HPV16 y Otros HR HPV detectado → POSITIVO (16 más cualquiera o combinaciones de 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
-	+	+	+/-*	HPV18 y Otros HR HPV detectado → POSITIVO (18 más cualquiera o combinaciones de 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
+	+	+	+/-*	HR HPV detectado → POSITIVE (16, 18 y cualquiera o combinaciones de 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
-	-	-	+	HR HPV no detectado → NEGATIVO (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
-	-	-	-	Prueba inválida, repetir extracción

* La detección del Control Interno en el canal VIC no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección de Texas Red, Cy5 o FAM. Una alta concentración/carga de ADN detectable en la muestra puede llevar a una señal de control interno reducida o ausente.

Nota: La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.

- Los resultados falsos negativos pueden ser causados por:
 - Recolección, manipulación y/o almacenamiento inadecuados de muestras.
 - Degradación de la muestra.
 - Presencia de inhibidores de qPCR.
 - Mutaciones en el genoma de los virus.
 - No seguir los procedimientos en este manual.
 - Uso de kits de recepción o plataformas de PCR en tiempo real no validados.
- Los resultados falsos positivos pueden ser causados por:
 - Manipulación inadecuada de muestras que contienen altas concentraciones de ADN de HR HPV. La alta susceptibilidad del método de qPCR a contaminaciones cruzadas requiere especial cuidado durante el aislamiento del ADN.
 - Contaminación cruzada con el control positivo debido a una manipulación inadecuada del mismo.
 - Manipulación inadecuada del producto amplificado (placa post-amplificación).

Los resultados negativos no excluyen la infección y el resultado de la prueba no debe usarse como único criterio para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. Además, esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos.

11. Evaluación del desempeño

El desempeño de este kit fue validado para los equipos especificados en la Sección 9.2 (véase anteriormente). Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

11.1. Resultados previstos

Se presentan trazados típicos de amplificación observados para muestras clínicas negativas para HPV (Figura 1A) o muestras de pacientes infectados con HR HPV (Figura 1B) en la Figura 1.

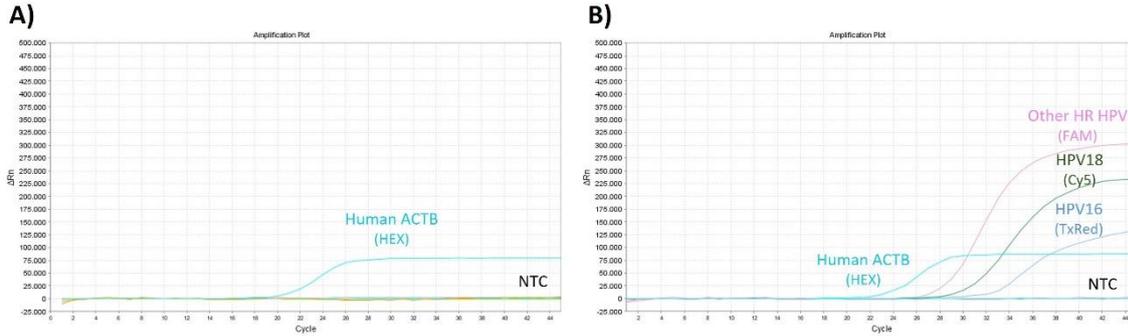


Figura 1. Curvas de fluorescencia representativas de HR VPH generadas por el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, en una muestra de hisopo cervical clínicamente negativa para VPH (Figura 1A) y una muestra de hisopo cervical de VPH de un paciente identificado como portador de HR VPH (Figura 1B). Curva azul: detección de ADN que alberga el objetivo de HPV16 a través del canal Texas Red; Curva verde: detección de ADN que alberga el objetivo de HPV18 a través del canal Cy5; Curva rosa: detección de ADN que alberga otros objetivos de HR VPH a través del canal FAM; Curva azul claro: detección del objetivo humano ACTB a través del canal VIC.

11.2. Límite de detección (LoD) - Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se definió como la concentración más baja de analito que podría detectarse de manera confiable con un 95% de confianza. Esto se evaluó probando ácidos nucleicos de HPV en diferentes cantidades de copias, particularmente, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 y HPV68, incorporados en ADN extraído de muestras de hisopo cervical negativas, utilizando tres lotes de kits diferentes siguiendo condiciones típicas de reacción de prueba. Las pruebas se repitieron durante 4 días y se determinó el LoD supuesto. La confirmación del LoD se realizó por dos operadores diferentes, utilizando tres lotes de kits en un experimento con un total de 48 réplicas. Los datos revelaron que el NZYtech High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, detecta el siguiente valor de LoD para cada tipo de HR HPV, con una confianza $\geq 95\%$. Todas las pruebas se realizaron utilizando el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 FAST y el análisis se realizó utilizando el software del equipo.

TIPO DE HPV	CONCENTRACIÓN (COPIAS/RX)	CONCENTRACIÓN (COPIAS/ML)	NÚMERO DE PRUEBAS POSITIVAS	% POSITIVAS	INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95%	
					INFERIOR	SUPERIOR
HPV16	15	750	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV18	15	750	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV31	7,5	375	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV33	50	2500	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV35	10	500	46/48	95,8%	86,0%	98,8%
HPV39	7,5	375	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV45	30	1500	46/48	95,8%	86,0%	98,8%
HPV51	25	1250	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV52	20	1000	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV56	15	750	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV58	10	500	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV59	40	2000	46/48	95,8%	86,0%	98,8%
HPV66	30	1500	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV68	20	1000	46/48	95,8%	86,0%	98,8%

11.3. Especificidad Analítica

11.3.1. Reactividad Cruzada (Exclusión) y Especificidad

La reactividad cruzada y la inclusividad se evaluaron mediante análisis in silico de sondas de oligonucleótidos y cebadores incluidos en el kit frente a patógenos relacionados con el Virus del Papiloma Humano. También se analizaron patógenos colonizadores humanos comúnmente encontrados en muestras clínicas. Los cebadores y sondas del ensayo fueron cribados contra secuencias genómicas publicadas. Tras el análisis in silico, se encontró que el diseño del ensayo detecta los catorce HR HPVs (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 y HPV68) y no presenta reactividad con especies no relacionadas.

Además del análisis in silico, se probó el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, con un panel de bacterias, hongos y virus, incluyendo aquellos comúnmente encontrados en el tracto urogenital femenino, así como algunos tipos de VPH clasificados como de bajo riesgo. La reactividad cruzada del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, se evaluó utilizando los siguientes patógenos: *Bifidobacterium breve*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus avium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus pneumoniae*,

Streptococcus pyogenes, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium genitalium* y *Bacteroides fragilis*. Los ensayos se realizaron utilizando el ADN genómico de los organismos mencionados anteriormente. Además, se realizó una prueba experimental utilizando siete muestras inactivas que son representativas de muestras clínicas humanas, incluyendo *Candida albicans* (cepa Z006), *Gardnerella vaginalis* (cepa Z247), *Atopobium vaginae* (cepa Z242), *Trichomonas vaginalis* (cepa Z070), *Candida glabrata* (cepa Z007), *Lactobacillus crispatus* (cepa Z246) y *Candida krusei* (cepa Z009). Además, se probaron muestras clínicas de VPH de bajo riesgo (HPV6/11, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV53, HPV54, HPV53/73 y HPV82) con el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Todas las pruebas se realizaron por triplicado utilizando tres lotes del kit. Los datos confirmaron que ninguno de los microorganismos probados generó una señal de amplificación.

11.3.2. Sustancias que interfieren

El impacto de 20 sustancias biológicas y químicas potencialmente interferentes que pueden estar presentes en el área de muestreo, incluida sangre humana completa, antimicrobianos, cremas antifúngicas, productos de lavado o humectantes, fueron evaluados en cuanto a su posible interferencia con el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Los ensayos se realizaron utilizando muestras cervicales negativas (almacenadas en solución ThinPrep PreservCyt®) a las que se les agregaron muestras positivas de HPV16 y HPV18 a ~2-3 veces el Límite de Detección (LoD). Las sustancias potencialmente interferentes se añadieron a las muestras manipuladas a concentraciones que representan los niveles más altos esperados en muestras cervicales humanas, según datos de la literatura. Todas las extracciones/ensayos se realizaron por duplicado utilizando un lote de kits y se compararon con los datos obtenidos con un control que no contenía interferentes. A las concentraciones probadas, los resultados revelaron que ninguna de las moléculas analizadas afectó la sensibilidad del kit. Sin embargo, la solución vaginal de BETADINE® podría causar interferencia si se utiliza a concentraciones superiores al 0,04% v/v. La tabla a continuación resume los datos recopilados en estos experimentos.

POTENCIAL INTERFERENTE	INGREDIENTES ACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA MUESTRA	INTERFERENCIA SÍ (S) O NO (N)		
			HPV16	HPV18	OTROS HR HPV's
Anidulafungin (antifúngico)	Anidulafungin	10% v/v	N	N	N
Flucytosine (antifúngico)	Flucytosine	10% v/v	N	N	N
Voiconazole (antifúngico)	Voriconazole	10% v/v	N	N	N
Anfotericina B (antifúngico)	Anfotericina B desoxicolato	10% v/v	N	N	N
Gino-Canesten® (antifúngico)	Clotrimazol (10 mg/ml)	10% w/v	N	N	N
Lomexin® (antimicrobiano)	Nitrato de fenticonazol	10% w/v	N	N	N
Progeffik® (Medicina)	Progesterona (5 mg/mL)	10% v/v	N	N	N
BETADINE® Vaginal (Producto de Lavado)	Yodopovidona (100 mg/mL)	0,04% v/v	N*	N*	N*
Producto de Lavado	PEG-7 Gliceril Cocoato, Propilenglicol	10% v/v	N	N	N
Producto de Lavado	Ácido láctico	10% v/v	N	N	N
Lubricante Warm Up Cherry	Hidroxietil celulosa, Gluconato de clorhexidina	10% w/v	N	N	N
ClimaCare (Producto Tópico)	Ácido hialurónico, Ácido láctico	10% w/v	N	N	N
WOMAN ISDIN (Producto Tópico)	Glicerina, Poliacrilato de glicerilo, Ácido poliacrílico	10% w/v	N	N	N
Microlax® (Laxantes)	Citrato de sodio dihidratado, Lauroilsarcosinato de sodio	5% v/v	N	N	N
Scheriproct® (Pomadas Anti-Hemorroidales)	Prednisolona, Cinchocaína	10% w/v	N	N	N
Orina (humana)	-	10% v/v	N	N	N
Sangre completa (humana)	-	10%; 25% v/v	N	N	N
Plasma (humano)	-	10% v/v	N	N	N
Moco (estómago porcino, tipo II)	-	0,3% w/v	N	N	N
Crema Zovirax®	Aciclovir	7% w/v	N	N	N
Control sin ninguna sustancia interferente	H ₂ O	5% v/v	N	N	N

* La solución vaginal de BETADINE® interfirió con el ensayo cuando estaba presente en concentraciones > 0,04% v/v.

11.4. Precisión

La precisión del ensayo para el kit NZYtech's High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD se determinó mediante la prueba repetida de muestras positivas de HPV16, HPV18 y HPV45 que representan dos niveles de carga viral, 3x LoD y 30x LoD copias por reacción, agregadas al ADN extraído de muestras cervicales negativas, utilizando 3 lotes de kits diferentes y siguiendo las condiciones típicas de reacción del ensayo. La precisión se evaluó midiendo el promedio de Cq, el coeficiente de variación de Cq y el % de detección de réplicas, como se describe a continuación para cada caso. Los datos se resumen en las tablas que se muestran a continuación.

Precision del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, mientras detecta el gen diana del HPV16.

VARIABLE PROBADA		HPV16 (COPIAS/REACCIÓN)	
		3x LOD	30x LOD
REPETIBILIDAD	n	12	12
	Promedio de Cq	33,86	30,37
	Coefficiente de Variación (%)	0,61	0,79
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	48	48
	Promedio de Cq	33,65	30,34
	Coefficiente de Variación (%)	1,25	0,87
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE	n	36	36
	Promedio de Cq	33,70	30,37
	Coefficiente de Variación (%)	1,06	0,63
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD OPERADOR	n	36	36
	Promedio de Cq	33,79	30,38
	Coefficiente de Variación (%)	0,68	0,71
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD INTER-INSTRUMENTO	n	60	60
	Promedio de Cq	33,74	30,62
	Coefficiente de Variación (%)	1,49	1,28
	% de Detección en Réplicas	100	100

Precision del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, mientras detecta el gen diana del HPV18.

VARIABLE PROBADA		HPV18 (COPIAS/REACCIÓN)	
		3x LOD	30x LOD
REPETIBILIDAD	n	12	12
	Promedio de Cq	34,31	30,75
	Coefficiente de Variación (%)	0,59	0,70
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	48	48
	Promedio de Cq	34,20	30,81
	Coefficiente de Variación (%)	1,13	1,16
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE	n	36	36
	Promedio de Cq	34,13	30,71
	Coefficiente de Variación (%)	0,98	0,67
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD OPERADOR	n	36	36
	Promedio de Cq	34,28	30,78
	Coefficiente de Variación (%)	0,82	0,85
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD INTER-INSTRUMENTO	n	60	60
	Promedio de Cq	33,99	30,81
	Coefficiente de Variación (%)	1,56	1,35
	% de Detección en Réplicas	100	100

Precisión del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, mientras detecta el gen diana del HPV45.

VARIABLE PROBADA		HPV45 (COPIAS/REACCIÓN)	
		3x LOD	30x LOD
REPETIBILIDAD	n	12	12
	Promedio de Cq	34,04	30,35
	Coefficiente de Variación (%)	1,28	0,56
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	48	48
	Promedio de Cq	34,01	30,34
	Coefficiente de Variación (%)	1,52	0,73
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE	n	36	36
	Promedio de Cq	34,03	30,33
	Coefficiente de Variación (%)	1,59	0,67
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD OPERADOR	n	36	36
	Promedio de Cq	34,08	30,38
	Coefficiente de Variación (%)	1,46	1,03
	% de Detección en Réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD INTER-INSTRUMENTO	n	60	60
	Promedio de Cq	33,69	30,16
	Coefficiente de Variación (%)	2,02	1,17
	% de Detección en Réplicas	100	100

11.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada por un operador analizando 12 réplicas de cada muestra (copias 3x LoD y 30x LoD por reacción), lo que resulta en un total de 24 pruebas realizadas por objetivo.

11.4.2. Reproducibilidad Diaria

La reproducibilidad diaria fue evaluada por un operador analizando 48 réplicas de cada muestra (copias 3x LoD y 30x LoD por reacción), durante 4 días, con 12 réplicas de cada concentración por día (se realizaron un total de 96 ensayos por objetivo).

11.4.3. Reproducibilidad Lote a Lote

La reproducibilidad entre lotes fue evaluada por un operador a través del análisis de 36 réplicas de cada muestra (copias 3x LoD y 30x LoD por reacción) utilizando 3 lotes de kits diferentes con 12 réplicas por lote.

11.4.4. Reproducibilidad del Operador

La reproducibilidad del operador fue evaluada mediante la realización de pruebas con 36 réplicas de cada muestra (copias 3x LoD y 30x LoD por reacción) por tres operadores diferentes, con 12 réplicas por operador y por carga viral, lo que resulta en un total de 24 réplicas por operador, incluyendo los 3 objetivos del kit.

11.4.5. Reproducibilidad entre Instrumentos

La reproducibilidad entre instrumentos fue medida por un operador mediante la realización de pruebas con 60 réplicas de cada muestra (copias 3x LoD y 30x LoD por reacción) en cinco instrumentos de qPCR diferentes, en un total de 12 pruebas por equipo.

FABRICANTE DEL EQUIPO PCR EN TIEMPO REAL	MODELO DE PLATAFORMA PCR EN TIEMPO REAL
Applied Biosystems®	7500 FAST
	QuantStudio™ 5
	QuantStudio™ 5 Dx
Bio-Rad®	CFX C1000 Touch Real-time PCR
	CFX Opus Real-time PCR

11.5. Evaluación clínica

Las características de rendimiento clínico del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, se evaluaron en cuatro grupos distintos de muestras cervicales caracterizadas mediante técnicas de PCR isotérmica y qPCR en tiempo real. En este estudio clínico se incluyeron un total de 359 muestras clínicas de hisopo cervical almacenadas en solución PreservCyt® (Hologic) o medio de Amies, recogidas de mujeres de diferentes edades y con un resultado válido para citología.

El rendimiento clínico del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, se evaluó utilizando 139 muestras cervicales caracterizadas mediante un kit comercial de PCR isotérmica. Los ácidos nucleicos fueron extraídos por un laboratorio externo y luego amplificados utilizando el High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Los datos revelaron una sensibilidad clínica (PPA) del 100% para la detección de HPV16 y HPV18, y del 94% para Otros HR HPV. La especificidad clínica (NPA) para la detección de HPV16 fue del 95%, para HPV18 fue del 99% y para Otros HR HPV fue del 100%.

Además, también se realizó una comparación del rendimiento clínico del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, con pruebas comparadoras de PCR en tiempo real utilizando muestras cervicales. Un total de 220 muestras clínicas fueron caracterizadas utilizando tres kits comerciales de PCR en tiempo real. Los datos revelaron una sensibilidad clínica (PPA) del 100% para la detección de HPV16 y HPV18, y del 83% para Otros HR HPV. La especificidad clínica (NPA) para la detección de HPV16 y HPV18 fue del 100%, mientras que para Otros HR HPV fue del 98%.

Los datos que resumen el rendimiento clínico del High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, en comparación con los kits comparadores de PCR isotérmica y en tiempo real se presentan en la siguiente tabla.

PRUEBA COMPARADORA	DIANA	VP	VN	FP	FN	SENSIBILIDAD (95% IC)	ESPECIFICIDAD (95% IC)
PCR isotérmica	HPV16	10	123	6	0	100% (72-100%)	95% (90-98%)
	HPV18	5	133	1	0	100% (57-100%)	99% (96-100%)
	Otros HR HPV	63	72	0	4	94% (86-98%)	100% (95-100%)
PCR en tiempo real	HPV16	36	183	1	0	100% (90-100%)	100% (97-100%)
	HPV18	22	197	1	0	100% (85-100%)	100% (97-100%)
	Otros HR HPV	59	146	3	12	83% (73-90%)	98% (94-99%)

Notes: VP=Verdadero Positivo; VN=Verdadero Negativo; FP=Falso Positivo; FN=Falso Negativo; IC=Intervalo de Confianza.

12. Control de calidad

Todos los componentes del NZYtech's High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD se prueban siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El sistema de PCR en tiempo real multiplex permite la detección de los blancos descritos para la identificación del HPV16, HPV18, doce HR HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), así como del gen de la β -actina humana (ACTB). Las amplificaciones positivas se observan para los genes diana, el control positivo y los controles internos a través de los canales Texas Red, Cy5, FAM y VIC.

13. Apoyo técnico

Para soporte técnico, comuníquese con nuestro equipo de soporte técnico dedicado por teléfono: +351 (0) 21 364 35 14 o correo electrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registradas y descargos de responsabilidad

Todas las marcas registradas que aparecen en este manual son propiedad de sus respectivos dueños.

15. Explicación de los símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar instrucciones de uso
	Número de catálogo		Fabricante
	Código de lote		Usar por
	Limitación de temperatura		Suficiente para
	Control positivo		Mantener alejado de la luz solar (mezcla de cebador/sonda)
	Control negativo		

16. Declaración de conformidad

Nombre del producto: High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD04921

Uso previsto: Detección cualitativa de High-risk HPV (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

Clasificación: Otros (no incluidos en el anexo II o no destinado a autodiagnóstico) según la Directiva 98/79/CE.

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Nosotros, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos por la presente que este producto, al que hace referencia esta declaración de conformidad, cumple con los siguientes estándares y demás documentos normativos ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, de acuerdo con las disposiciones de la Directiva 98/79/CE y Regulación (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*, incorporada a la legislación nacional de los Estados Miembros de la Unión Europea.

El archivo técnico del producto se conserva en NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, PhD

Diretora Técnica

17. Referencias

1. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol.* 2021 Mar;102(3):001540. doi: 10.1099/jgv.0.001540. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33427604; PMCID: PMC8148304.
2. Bordigoni A, Motte A, Tissot-Dupont H, Colson P, Desnues C. Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. *Sci Rep.* 2021 Feb 17;11(1):4039. doi: 10.1038/s41598-021-83489-2. PMID: 33597592; PMCID: PMC7889863.
3. Meites E.; Gee J.; Unger E. and Markowitz L. Human Papillomavirus (2021) <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hpv.html>.
4. Manini, I., & Montomoli, E. (2018). Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Ann Ig,* 30(4), 28-32.
5. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70158-5. PMID: 17597569.
6. Luo, Q., Zeng, X., Luo, H. et al. Epidemiologic characteristics of high-risk HPV and the correlation between multiple infections and cervical lesions. *BMC Infect Dis* 23, 667 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08634-w>.
7. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, Clifford GM. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer.* 2012 Nov 15;131(10):2349-59. doi: 10.1002/ijc.27485. Epub 2012 Mar 20. PMID: 22323075.
8. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: The Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev* (2016) 29:291–319. doi: 10.1128/cmr.00013-15.
9. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2020 Jul;40(5):602-608. doi: 10.1080/01443615.2019.1634030. Epub 2019 Sep 10. Erratum in: *J Obstet Gynaecol.* 2020 May;40(4):590. PMID: 31500479; PMCID: PMC7062568.
10. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination-Review of Current Perspectives. *J Oncol.* 2019 Oct 10;2019:3257939. doi: 10.1155/2019/3257939. PMID: 31687023; PMCID: PMC6811952.
11. Burd EM. Human Papillomavirus Detection and Utility of Testing. *Clin Microbiol Newsl* (2007) 29:159–67. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2007.10.001.

